Untersuchungen über die Amidaseaktivität von aus Schweinelymphknoten isolierten Mycobakterien

Gerhard Hans Sachs

1962

Aus dem Institut für Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. Meyn

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AMIDASEAKTIVITÄT VON AUS SCHWEINELYMPHKNOTEN ISOLIERTEN MYCOBAKTERIEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Gerhard Hans Sachs

aus

Nürnberg

München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. Konrad Ullrich

Referent: Prof. Dr. Adolf Meyn

Tag der Promotion: 27. Februar 1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

UNI-Druck München 13 Amalienstraße 85

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	DAS FERMENTATIVE VERHALTEN VON MYCOBAKTERIEN ALS HILFSMITTEL ZU IHRER ART- UND TYPENBESTIMMUNG	2
III.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	9
	A. Material	9
	B. Methodik	11
	C. Untersuchungsergebnisse	14
	1. Vorversuche	14
	a) Einfluß der Dichte der Bakteriensuspension auf den Verlauf der Desamidierung	14
	b) Beständigkeit und Ammoniakgehalt der Substrate (Amid-Lösungen)	15
	c) Einfluß der Bebrütungstemperatur auf den Verlauf der Desamidierung	16
	d) Einfluß unterschiedlicher Mengenverhältnisse der 3 Reagenzien auf das Ergebnis des NH_3-Nachweises nach RUSSELL	17
	2. Hauptversuche	18
	a) Untersuchung der acylamidatischen Ausrüstung von aus Schweinelymphknoten gewonnenen Mycobakterien	18
	b) Vergleich der enzymatischen Ausrüstung von 6 Stämmen vor und nach Hühnerpassage	27
	c) Fermentative Leistungen von 9 "atypischen" Mycobakterien-Stämmen	28
	d) Enzymatische Ausrüstung von 30 Stämmen M. avium	29
IV.	BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	32
V.	ZUSAMMENFASSUNG	36
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	37
	LEBENSLAUF	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0013

I. EINLEITUNG

Nachdem in den letzten Jahren immer öfter aus schweren kavernösen Lungenprozessen, die das klinische Bild von Tuberkulose zeigten, als Krankheitserreger sogenannte "atypische" Tuberkelbakterien, "unklassifizierte" oder "avium-ähnliche" Mycobakterien isoliert wurden, gewann diese Mycobakterien-Gruppe für die Tuberkuloseforschung erheblich an Bedeutung. Da die bisher verwendete Gruppeneinteilung der "unklassifizierten" Mycobakterien nur als Arbeitsgrundlage geschaffen worden ist und ihre Lückenhaftigkeit durch neuere Untersuchungen aufgezeigt wurde, ist die taxonomische Einordnung dieser Mycobakterien zum Teil noch ungeklärt.

Für die Differentialdiagnose von Arten der Gattung Mycobacterium sind nun u. a. auch einige Verfahren ausgearbeitet worden, die auf dem Nachweis von qualitativ und quantitativ unterschiedlichem Gehalt an Fermenten beruhen. Brauchbare Ergebnisse wurden besonders von Bönicke mit den Acylamidasen erzielt, die aromatische und aliphatische Carbonsäureamide zu desamidieren vermögen.

Es war meine Aufgabe, eine große Anzahl von Mycobakterien-Stämmen, die aus Darmlymphknoten von Schweinen isoliert worden waren, auf ihr fermentatives Verhalten gegen diese Carbonsäureamide zu untersuchen.

II. DAS FERMENTATIVE VERHALTEN VON MYCOBAKTERIEN ALS HILFSMITTEL ZU IHRER ART- UND TYPENBESTIMMUNG

Für den Stoffwechsel - und damit für das Leben und die Fortpflanzungsfähigkeit - aller Bakterien ist das Vorhandensein von Fermenten, die bestimmte chemische Vorgänge katalysieren, unbedingt nötig. Da die zahlreichen Bakterienarten unter den verschiedensten Bedingungen leben und sich aus unterschiedlichen chemischen Verbindungen die für sie lebensnotwendigen Substanzen synthetisieren müssen, ist ihre enzymatische Ausrüstung qualitativ und quantitativ nicht einheitlich. Umfassende wissenschaftliche Arbeiten über den durch Enzyme katalysierten Stoffwechsel der Bakterien liegen noch nicht vor, doch ist über Teilprobleme häufig gearbeitet worden. Sicher ist, daß nicht alle der in Bakterienzellen nachgewiesenen Fermente für die Bakterien lebenswichtig sind, worauf Bönicke und sein Mitarbeiter Lisboa (9a) z. B. bei Acylamidasen in Mycobakterien hinwiesen. Wissenschaftlich bewiesen wurde das Vorkommen von Bakterienfermenten schon am Ende des vorigen Jahrhunderts; über ihre physiologische Bedeutung aber wurden nur Vermutungen angestellt.

Eines der am ersten genauer untersuchten Enzyme war die die Harnstoffspaltung katalysierende Urease, die im Jahre 1926 von dem Amerikaner Sumner aus der Jackbohne in reinem, kristallisiertem Zustand dargestellt wurde. Soehngen (27) fand im Jahre 1913 Urease in Mycobacterium album und Mycobacterium hyalinum. Corper und Sweany (11) wiesen Urease in humanen und bovinen Tuberkelbakterien nach. Johanna Püschel (24) fand ein neues kulturdifferentialdiagnostisches Merkmal in der Harnstoffzersetzung durch Pseudodiphteriebazillen und der Harnstoffindifferenz der echten Diphteriebazillen. Kleinsorgen und Commichau (18) bestätigten ihre Befunde durch Nachweis der Urease-Reaktion auf einer Harnstoff-Indikator-Platte, fanden aber, daß nicht die Ureaseaktivität der Pseudodiphteriebazillen einem gänzlichen Fehlen von Urease in echten Dyphteriebazillen gegenüberstand, sondern daß in allen untersuchten Stämmen Urease vorhanden war. Die quantitativen Unterschiede waren allerdings so groß, daß das Verfahren zur Differentialdiagnose geeignet schien. Auch Wohlfeil und Weiland (36) erzielten nach Untersuchungen an einer großen Zahl von Stämmen das gleiche

Ergebnis. Daneben wurden von diesen Autoren noch insgesamt 400 Stämme, u. a. Staphylokokken, Coli- und Bangbakterien auf den Gehalt an Urease geprüft. Positive Befunde ergaben sich nur bei einigen Stämmen von Staphylokokken und Bacterium coli, bei allen untersuchten Stämmen von Bacterium vulgare, Bacterium pseudotuberculosis rodentium, Corynebacterium pseudodiphteriticum und bei den tierpathogenen Stämmen von Bacterium abortus Bang. Alte Laborstämme des letzteren zeigten aber keine Ureasetätigkeit. Auch alle anderen geprüften Bakterien spalteten keinen Harnstoff. Mit seinem Mitarbeiter Wollenberg prüfte Wohlfeil (37) vielerlei Bakterien auf Urease. Sämtliche untersuchten Tuberkelbakterien humanen und bovinen Typs waren negativ. Bei Bangbakterien fiel wiederum auf, daß nicht alle Kulturen einheitlich reagierten. In diesem Fall bildeten die jungen Kulturen Urease, während einige ältere Kulturen negativ blieben. Ein Stamm von Brucella melitensis zeigte in den Kulturen zweier Institute entgegengesetzte Resultate, obwohl er derselben Herkunft war. Singer und Cysner (27) stellten fest, daß alle Mycobakterien Urease bildeten, daß aber die Dauer der Reaktionszeit sehr variiert. Kein Tuberkelbakterien-Stamm der humanen und bovinen Varianten spaltete Harnstoff in weniger als 12 Stunden, Mycobacterium avium zeigte erst in 12 bis 15 Tagen eine Reaktion. Tacquet et al. (31) prüfte mit mehreren verschiedenen Methoden humane, bovine und aviäre Tuberkelbakterien sowie saprophytäre Mycobakterien. Sofern die Kulturen 20 bis 30 Tage alt waren und eine genügende Anzahl von Keimen dem Harnstoff-Substrat zugefügt wurde, ergab sich in den Versuchen dieser Autoren bei den humanen Stämmen stets eine prompte Hydrolyse des Harnstoffs, während die bovinen Stämme ureasenegativ blieben. Andrade und Ferreira (1) untersuchten 109 verschiedene Mycobakterien-Stämme mit einer direkten (Titration und colorimetrische p_H-Bestimmung) und einer indirekten Nachweismethode (Titration nach Belüftung nach dem Vorgang von van Slyke und Cullen), wobei sie der indirekten Methode wegen ihrer besseren Eignung für die quantitative Bestimmung den Vorzug gaben. Die gefundenen Werte schwankten innerhalb der einzelnen Mycobakterien-Arten beträchtlich. Beim Typus humanus betrug bei einigen Stämmen die Menge der Harnstoffspaltprodukte mehr als das Vierzigfache dessen, was andere Stämme desselben Typus unter den gleichen Bedingungen gebildet hatten. Die Streuung war unter den bovinen Stämmen nicht so groß, unter den aviären sogar ziemlich gering. Als Differentialdiagnostikum

zwischen den Tuberkelbakterientypen ist das von den Autoren beschriebene Verfahren jedoch nicht geeignet. Toda et al. (32) beschrieben einen einfach auszuführenden Urease-Test, um die säurefesten Bakterien zu klassifizieren. An 141 Mycobakterien-Stämmen und einem Nocardia-Stamm wurde Vorkommen von Urease oder deren Fehlen festgestellt. Ureasepositiv zeigten sich alle humanen, bovinen und avium-ähnlichen (socalled "avian") Stämme, während alle Stämme von Mycobacterium avium negativ waren. Alle zur photochromogenen Gruppe gehörenden Stämme zeigten Ureasewirkung; die scotochromogenen Stämme reagierten teils positiv und teils negativ, ebenso die saprophytären Mycobakterien. Bönicke prüfte mit seinen Mitarbeitern Dittmar und Lisboa (9b) 231 Stämme aus den verschiedenen Arten und Varianten der Gattung Mycobacterium vergleichend auf ihre Ureaseaktivität. Die höchsten Werte ergaben sich bei den schnell wachsenden Mycobakterien-Arten M. smegmatis und M. phlei. Mycobacterium tuberculosis var. hominis et bovis sowie M. fortuitum, M. balnei und M. thamnopheos erwiesen sich als ureasepositiv. Alle Stämme von Mycobacterium avium waren negativ. Die negativen Ureasebefunde von Wohlfeil-Wollenberg stehen allen anderen erwähnten Befunden entgegen. Bei der humanen Variante des Tuberkelbakteriums wurde von den anderen Untersuchern Ureasetätigkeit festgestellt; bei der bovinen Variante fanden neben Wohlfeil und Wollenberg auch Tacquet und Mitarbeiter keine Urease, was im Widerspruch zu den übrigen Ergebnissen steht.

Whitehead et al. (34) untersuchten 212 Bakterien-Stämme auf das Vorhandensein von Arylsulfatase (Phenolsulfatase) und fanden diese nur bei einigen Arten von Salmonellen und Mycobakterien. Unterschiedliche Ergebnisse zeigten sich jedoch auch bei Stämmen gleicher Artzugehörigkeit. Weitere Untersuchungen an 154 Stämmen von Mycobakterien, darunter 66 humanen, 27 bovinen und 2 aviären, ergaben, daß sämtliche humanen Stämme keine Hydrolyse von Phenolphthaleindisulfat (Arylsulfatase-Aktivität) zeigten, ebensowenig 24 der 27 bovinen Stämme, von denen die 3 weiteren schwach Phenolphthaleindisulfat spalteten. Auch die beiden aviären Stämme zeigten schwache Hydrolyse. Fast alle anderen Mycobakterium-Arten (M. phlei, M. smegmatis und Kaltblüter-Mycobakterien) zeigten stärkere oder sehr starke Aktivität. Wayne et al. (33) fanden bei mit den gleichen Reagenzien durchgeführten Untersuchungen die Tuberkelbakterien arylsulfatase-negativ. Von 5 nachuntersuchten

Avium-Stämmen reagierten jedoch bei großem Inokulum nach 2 Wochen alle positiv. Kubica und Vestal (20) bestätigten den ausgeprägten Mangel an Arylsulfatase in humanen, bovinen und aviären Tuberkelbakterien, während sie alle zur Gruppe III nach RUNYON gehörenden nichtchromogenen Mycobakterien als positiv befanden. Die Autoren betrachten den Mangel an Arylsulfatase jedoch nur als quantitative und nicht als qualitative Beschaffenheit. Bei Durchführung der von ihnen angegebenen Versuchsmethode dürfen also keine höheren Bakterienkonzentrationen und keine längeren Reaktionszeiten zur Anwendung kommen. Für die Differentialdiagnose von Mycobacterium avium und den nichtphotochromogenen Mycobakterien der Gruppe III ist die Untersuchung auf das Vorhandensein von Arylsulfatase nach Ansicht der Autoren von größter Bedeutung.

Konno et al. (19) beschreiben Versuche, in denen sie Tuberkelbakterien auf die Fähigkeit zur Nikotinsäure-Synthese aus den Aminosäuren des Nährbodens prüften. Die humanen Stämme bildeten sehr deutlich mehr Nikotinsäure als die bovinen und aviären Stämme. Unterschiede zwischen pathogenen und abgeschwächten Stämmen konnten nicht festgestellt werden. Die Prüfung des Nikotinsäurebildungsvermögens dient heute als ein verlässliches Hilfsmittel bei der Differenzierung humaner und boviner Tuberkelbakterien.

Hughes und Williamson (15) wiesen 1953 in mehreren Stämmen von Lactobacillus albus und in einem von 12 Stämmen Staphylococcus albus ein die Spaltung von Nikotinamid zu Nikotinsäure und Ammoniak bewirkendes Ferment, die Nikotinamidase, nach. 1957 untersuchten Halpern und Grossowicz (14) je einen Stamm von Mycobacterium phlei und Mycobacterium tuberculosis var. bovis (BCG), wobei sie in dem Phlei-Stamm sowohl Acetamidase und Nikotinamidase als auch einige andere streng spezifische Fermente fanden. Die bei Mycobacterium phlei vorhandene Asparaginase spaltete nur l-Asparagin und blieb gegen d-Asparagin wirkungslos. Benzamidase konnte in beiden Stämmen nicht nachgewiesen werden. Kimura (17) gewann aus Stämmen von Mycobacterium avium das Enzym Nikotinamidase nach bis zu 280facher Reinigung. Auch in Mycobacterium phlei und M. smegmatis fand der Autor Nikotinamidase und Asparaginase. Acetamidase war nur in M. smegmatis vorhanden. Bönicke und Lisboa (8) untersuchten 10 Tuberkelbakterien-Stämme vom Typus humanus und 15 Stämme vom Typus bovinus auf die Fähig-

keit, Nikotinamid zu spalten. Das Ergebnis fiel eindeutig aus: alle humanen Stämme bildeten das Enzym Nikotinamidase, alle bovinen Stämme blieben negativ. Die Verfasser weisen auf die Übereinstimmung mit der Chemosensibilität gegen das als Tuberkulostatikum verwendete Pyrazinamid hin: alle humanen Stämme zeigen Sensibilität, alle bovinen Resistenz. Der Nikotinamidase-Nachweis stellt nach Ansicht der Autoren eine sichere Methode zur Differenzierung der beiden Säugertypen des Tuberkelbakteriums dar.

Bönicke unterzog eine größere Anzahl von Stämmen der schnell wachsenden Mycobakterien-Arten in 2 Versuchsreihen (4, 5) der Prüfung auf enzymatische Tätigkeit gegen Benzamid und Bernsteinsäureamid (Succinamid). Der Nachweis der Enzymwirkung erfolgte durch je eine direkte und eine indirekte Methode; der als Spaltprodukt entstandene Ammoniak kann nach 2 Stunden direkt nachgewiesen werden, der indirekte Nachweis erfolgt durch Züchtung der Stämme auf synthetischen Nährmedien, in denen Benzamid bzw. Succinamid als alleinige C- und N-Quelle enthalten sind. Auf diesen Nährböden wachsen nur Stämme, die die Amidgruppe des Benz- bzw. Succinamids abzuspalten vermögen und die entstehende Benzoe- oder Bernsteinsäure als C-Quelle verwerten können. Von den untersuchten Mycobakterien besaß nur M. smegmatis die Fähigkeit, diese beiden Substrate fermentativ zu spalten. Das Vorkommen von Benzamidase oder Bernsteinsäureamidase ist mithin charakteristisch für die Art Mycobacterium smegmatis und kann mit der von Bönicke angegebenen Methode als einfach anzuwendendes Diagnostikum dienen. Bönicke (9) erweiterte die Reihe der als Substrat verwendeten Amide auf 10, wobei er nur Amide aromatischer und aliphatischer Carbonsäuren heranzog, um die Desamidierung dieser Carbonsäureamide durch sogenannte "einfache" Acylamidasen zu erforschen. Mit Einhaltung der Reihenfolge: 1) Acetamid, 2) Benzamid, 3) Carbamid, 4) Isonicotinamid, 5) Nikotinamid, 6) Pyrazinamid, 7) Salicylamid, 8) Allantoin, 9) Succinamid, 10) Malonamid untersuchte der Autor (9d) eine sehr große Anzahl von Mycobakterien und konnte für einzelne schnell wachsende Arten spezifische Spektren erzeugen, indem die Proben der fermentativ gespaltenen Substrate nach Ammoniaknachweis mit der Methode von RUSSELL eine auffallende tiefblaue Verfärbung zeigten. Das für Mycobacterium avium zutreffende Spektrum ist in dieser Versuchsanordnung die Blaufärbung von Röhrchen 5 und 6, die Nikotinamid und Pyrazinamid enthalten.

Die Übereinstimmung in der enzymatischen Ausrüstung bestärkte Bönicke (6) in der Annahme, daß aviäre Stämme und "aviumähnliche" Stämme der Gruppe III nach Runyon zur gleichen Art gehören, und daß letztere lediglich für das Huhn avirulente Varianten seien. Gertrud Meissner (22) führte an 100 solcher "atypischen" Mycobakterien-Stämme der Gruppe III nach Runyon kulturelle und tierexperimentelle Untersuchungen mit dem Ziel durch, die avium-ähnlichen Keime dieser Gruppe sicher von den "echten" Avium-Stämmen abzugrenzen. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden zwar in den Wachstumstemperaturen und in der Höhe der INH-Resistenz gefunden, doch traten sie nicht gesetzmäßig auf und sind daher als Differenzierungsverfahren nur bedingt verwertbar. Da die Virulenzgrade der "avium-ähnlichen" Keime äußerst unterschiedlich sind und praktisch von Avirulenz bis zu der hohen Virulenz reichen, die den "echten" Avium-Stämmen eigen ist, und da fernerhin Stämme, die als Krankheitserreger beim Menschen isoliert worden sind, keine Virulenz für Versuchstiere zeigten, kommt die Autorin zu dem Schluß, daß ein so variables Merkmal wie die Virulenz nicht geeignet sei, die Gruppe III der "atypischen" Mycobakterien in Untergruppen zu teilen. Die Bezeichnung "avium-ähnlich" sollte fallengelassen und die bisher so benannten Stämme als aviäre Mycobakterien mit geringer Tiervirulenz betrachtet werden. Freerksen (13) weist darauf hin, daß Virulenz und Pathogenität nicht gleichzusetzen sind. Abgetötete Mycobakterien, die nach Verlust der Fortpflanzungsfähigkeit als avirulent zu bezeichnen sind, können durchaus pathogen sein und reaktive Prozesse hervorrufen. Der Autor fordert die Einbeziehung der "Tuberkulose" als dominierende Unterabteilung in den übergeordneten Begriff der "Mycobakteriosen", nachdem immer wieder "atypische" Mycobakterien aus Krankheitsprozessen isoliert werden, die den durch "echte" Tuberkelbakterien hervorgerufenen durchaus gleichen.

Auch bei Haustieren sind wiederholt aus Herden, die tuberkulösen Prozessen glichen, Mycobakterien isoliert worden, die man zu den sog. "atypischen" Mycobakterien rechnen kann. So gehören nach Stöckl und Mathois (30) z. B. die von Baumann und Mit. aus käsigen Herden in Schweinelymphknoten isolierten Stämme in die Gruppe der photochromogenen und in die Gruppe der scotochromogenen Mycobakterien. Smith (28) hat die gesund erscheinenden Mesenteriallymphknoten von 700 Haustieren untersucht und daraus neben Mycobacterium johnei auch

eine beträchtliche Anzahl von aviären Stämmen isoliert, die sich später als apathogen für Meerschweinchen, jedoch hochgradig pathogen für Hühner erwiesen. Diese aviären Keime wurden bei 10 von 200 Schafen und bei 7 von 100 untersuchten Schweinen gefunden.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material

Insgesamt wurden 132 Stämme von Mycobakterien untersucht.

1. Gruppe

75 Mycobakterien-Stämme, die 6 bis 9 Monate vor Beginn der Versuche aus veränderten Darmlymphknoten von Schlachtschweinen isoliert worden waren. Die Weiterzüchtung erfolgte auf Nährböden nach Löwenstein-Jensen und Petragnani (mit Glycerin). Der Stamm Nr. 1 (S 1) zeigte orangerote Farbe, alle anderen Stämme waren nicht pigmentiert und gehörten auf Grund ihres Wachstumsverhaltens taxonomisch in die Gruppe der aviären oder avium-ähnlichen Mycobakterien.

Die Stämme trugen folgende Bezeichnungen:

1) S 1	21) S 28	41) S 60	61) S 92
2) S 2	22) S 32	42) S 62	62) S 94
3) S 3	23) S 35	43) S 66	63) S 95
4) S 4	24) S 37	44) S 67	64) S 97
5) S 6	25) S 38	45) S 68	65) S 100
6) S 7	26) S 40	46) S 69	66) S 101
7) S 9	27) S 43	47) S 70	67) S 102
8) S 10	28) S 44	48) S 72	68) S 103
9) S 11	29) S 45	49) S 73	69) S 104
10) S 12	30) S 46	50) S 74	70) S 105
11) S 15	31) S 47	51) S 79	71) S 106
12) S 16	32) S 49	52) S 80	72) S 107
13) S 18	33) S 50	53) S 81	73) S 110
14) S 19	34) S 51	54) S 82	74) S 112
15) S 20	35) S 52	55) S 83	75) S 113
16) S 21	36) S 53	56) S 85	
17) S 22	37) S 54	57) S 86	
18) S 23	38) S 55	58) S 88	
19) S 26	39) S 56	59) S 89	
20) S 27	40) S 58	60) S 90	

2. Gruppe

18 Kulturen, die frisch aus tuberkulös veränderten Organen von Hühnern isoliert worden waren. Es handelte sich dabei um 6 Stämme der 1. Gruppe, mit denen Virulenzteste an Hühnern durchgeführt wurden. Bei der Sektion der Hühner zeigten alle Tiere tuberkulöse Herde in den Organen. Aus jedem der 6 Tiere wurde je 1 Kultur aus Leber, Lunge und Milz angelegt und getrennt für die Amidaseteste verwendet.

76) S 3 Huhn Leber
77) S 3 Huhn Lunge
78) S 3 Huhn Milz
79) S 9 Huhn Leber
80) S 9 Huhn Lunge
81) S 9 Huhn Milz
82) S 45 Huhn Leber
83) S 45 Huhn Lunge
84) S 45 Huhn Milz
85) S 46 Huhn Leber
86) S 46 Huhn Lunge
87) S 46 Huhn Milz
88) S 67 Huhn Leber
89) S 67 Huhn Lunge
90) S 67 Huhn Milz
91) S 86 Huhn Leber
92) S 86 Huhn Lunge
93) S 87 Huhn Milz

3. Gruppe

9 Stämme von "atypischen" Mycobakterien aus der Stammsammlung des Tierhygiene-Instituts, davon zeigte der erste keine Pigmentbildung; die 8 weiteren gehörten zur Gruppe der photochromogenen Mycobakterien (Mycobacterium kansasii).

94) 79
95) 61
96) 69
97) 70
98) 74
99) 86
100) 87
101) 89
102) 92

4. Gruppe

30 Stämme von Mycobacterium avium aus der Stammsammlung des Tierhygiene-Instituts. Der Stamm Nr. 128 (Av 273) zeigte orangerote Pigmentbildung.

103) Av 1
104) Av 3
105) Av 5
106) Av 7
107) Av 8
108) Av 9
109) Av 10
110) Av 12

111) Av 16
112) Av 18
113) Av 27
114) Av 32
115) Av 56
116) Av 68 MS Subk
117) Av 68
118) Av 73
119) Av 75 I MS
120) Av 99 II MS Subk
121) Av 100 Subk
122) Av 106 II Subk
123) Av 111 II
124) Av 211
125) Av 234
126) Av 235
127) Av 258
128) Av 273
129) Av 301
130) Av 623
131) Av 2264
132) Av Gall W

Verwendete Reagentien:

Acetamid	(Hersteller: Merck, Darmstadt)
Succinamid (Bernsteinsäurediamid)	(Hersteller: Schuchardt, München)
Nikotinsäureamid	(Hersteller: Merck, Darmstadt)
Benzamid (Benzoesäureamid)	(Hersteller: Schuchardt, München)
Harnstoff (Urea pura)	(Vertrieb Bender & Hobein, München)

Für den Ammoniaknachweis nach RUSSELL:

Manganum sulfuricum, pro analysi (Mangan-(II)-sulfat)	(Hersteller: Merck, Darmstadt)
Phenolum, pro analysi	(Hersteller: Merck, Darmstadt)
Natrium hydricum puriss. in rotulis, pro analysi	(Hersteller: Merck, Darmstadt)
Kalium carbonicum, pro analysi	(Hersteller: Merck, Darmstadt)
Eulenturm-Chlorkalk Nr. 4	(Hersteller: Klepper, Melsungen)

B. Methodik

Herstellung der Bakteriensuspensionen

Mit einer sterilen Öse wurde der auf Eiernährböden nach Löwenstein-Jensen oder glycerinhaltigem Petragnani-Nährboden gezüchtete Bakterienrasen abgehoben und mit physiologischer Kochsalzlösung gut homogenisiert. Nach 7minütigem Zentrifugieren bei 3000 - 4000 Umdrechungen pro Minute

wurde die überstehende Flüssigkeit abgekippt und das Sediment noch einmal mit physiologischer Kochsalzlösung unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Abgießen der Flüssigkeit und 10minütigem Abtropfenlassen wurden die Zentrifugenröhrchen mit dem Bakteriensediment eine Stunde lang in den Brutschrank (37°C) gestellt, um das unterschiedliche Wasserbindungsvermögen der Bakterienstämme so weit wie möglich auszugleichen. Dann wurden die Bakterien gewogen und in m/15 Phosphatpuffer (pH 7,2) so suspendiert, daß sich 10 mg Bakterien in 1 ml Puffer befanden.

Herstellung der Amid-Substrate

Von jedem der 5 verwendeten Amide wurde eine 0,00164 molare Lösung hergestellt, wie Bönicke (9d) sie verwendete.

Nachweis der erfolgten Fermentwirkung

Die erfolgte Spaltung der Carbonsäureamide wurde durch Nachweis des neben der betreffenden Säure entstandenen Ammoniaks festgestellt. Dafür wurde die von Bönicke (8) empfohlene und beschriebene Methode nach RUSSELL benutzt, bei welcher das Vorhandensein von Ammoniak durch Grün-Blau-Färbung angezeigt wird.

Ammoniaknachweis nach RUSSELL

Herstellung der Reagenzien:

a) Mangansulfatlösung: 66,0 mg $MnSo_4$ + 4 H_2O werden in 100 ml aq. dest. gelöst.

b) Phenolreagens: Zu 250 g Phenol wurden 100 ml aq. dest. gegeben, kräftig geschüttelt, 540 ml 5n NaOH-Lösung (wässrig) zugefügt und so lange geschüttelt, bis das Phenol völlig gelöst war. Dann wurde mit aq. dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

c) Hypochlorit-Lösung: 25 g Chlorkalk wurden mit 300 ml heißem aq. dest. versetzt, unter Schütteln 135 ml 20%ige wässrige Kaliumcarbonat-Lösung zugegeben und danach zur Entfernung des möglicherweise vorhandenen Ammoniaks einige Male aufgekocht. Nach Abkühlung wurde mit aq. dest. auf 500 ml aufgefüllt und filtriert.

Phenolreagens und Hypochlorit-Lösung wurden in dunkler Flasche im Kühlschrank aufbewahrt.

Durchführung des NH_3-Nachweises: Zu 1,0 ml des Gemisches aus den Bakterien- und Amid-Lösungen wurden 0,1 ml Mangansulfat-Lösung, 1,0 ml Phenolreagens und 0,5 ml Hypochlorit-Lösung pipettiert. Nach guter Durchmischung erfolgte Erhitzung im Wasserbad auf 100°C für 20 Minuten.

Beurteilung des NH_3-Nachweis-Ergebnisses

Die Stärke der Enzymaktivität wurde durch Vergleich mit Bromthymolblau-Lösungen in Sörensen-Puffer abgelesen (26, S. 140), wobei die Kontrollröhrchen in Abständen von 0,2 für den pH-Bereich von 6,4 bis 7,2 Färbungen von gelb über grün nach blau zeigen. Es wurde folgendermaßen beurteilt:

gelb (pH 6,6 und darunter)	=	negativ	(-)
gelb-grün (6,7)	=	fraglich	($\pm$)
grün (6,8)	=	schwach positiv	(+)
blaugrün (7,0)	=	positiv	(++)
blau (7,2 und darüber)	=	stark positiv	(+++)

Versuchsansatz

Je 0,5 ml der Bakteriensuspension und der Substratlösung wurden in einem Reagenzglas gut gemischt und für eine bestimmte Zeit (t = 4, 12, 24 Stunden) in den Brutschrank (37°C) gebracht. Danach erfolgte der NH_3-Nachweis.

Kontrolle des Versuchsablaufes

Um das Vorhandensein von Ammoniak vor Eintritt der Fermentwirkung sicher auszuschließen, wurde von jeder verwendeten Bakteriensuspension 1,0 ml ohne Zusatz von Substrat unter den gleichen Bedingungen wie die Bakterien-Substrat-Gemische dem Ammoniak-Nachweis unterzogen. Ebenso wurden täglich je 1,0 ml aller in Anwendung kommenden Amid-Lösungen sowie der zum Waschen der Bakterien benutzten physiologischen Kochsalzlösung und des Puffers auf Ammoniakgehalt geprüft. Wenn nicht alle Kontrollröhrchen eindeutig ammoniakfrei waren, wurden die gleichzeitig angesetzten Versuche wiederholt.

C. Untersuchungsergebnisse

1. Vorversuche

Zur Einarbeitung in die Methodik der Amidasennachweise wurden verschiedene Vorversuche unternommen. Einige Ergebnisse dieser Versuche, die für die technische Durchführung der Reaktion wichtig sind, sind im folgenden kurz zusammengestellt worden.

a) Einfluß der Dichte der Bakteriensuspension auf den Verlauf der Desamidierung

Um die nicht in allen Fällen zu vermeidende Fehleinwaage von Bakterien nach erfolgtem Waschen und eventuellem Hängenbleiben von Resten der physiologischen Kochsalzlösung beurteilen zu können, wurden 10 Mycobakterien-Stämme in 4 verschiedenen Konzentrationen von Bakterien in Phosphatpuffer (5, 10, 15 und 20 mg auf 1 ml Puffer) auf das Nikotinamid-Spaltungsvermögen untersucht. Die gefundenen Mittelwerte zeigt Tabelle 1. Daraus geht hervor, daß die Halbierung der im allgemeinen verwendeten Bakterienmenge von 10 mg/ml bei der Reaktionszeit t = 12 Stunden ein negatives Ergebnis zur Folge hat, während alle anderen Konzentrationen positiv reagieren. Bei t = 4 Stunden ist die Verdopplung der Bakterienmenge besonders auffallend, da sie einen positiven Ausfall der Probe im Gegensatz zu den 3 anderen ergibt. Bei t = 24 Stunden liegen alle Ergebnisse im positiven Bereich, doch ist auch hier die Abhängigkeit der Fermentreaktion von der eingebrachten Bakterienmenge deutlich sichtbar.

Der Einfluß der Dichte der Bakteriensuspensionen auf das Amidspaltungsvermögen ist also so groß, daß für die Durchführung des Amidase-Tests standardisierte Bakteriensuspensionen verwendet werden müssen, deren Dichte so genau wie möglich eingestellt wurde.

Tabelle 1: Einfluß der Dichte der Bakteriensuspension auf den Verlauf der Desamidierung von Nikotinamid

Bakterien in mg (Feuchtgewicht) pro 1,0 ml Suspensionsmittel (Puffer)	Mittelwerte der Nikotinamidase-Aktivität von 10 Stämmen nach der Reaktionszeit von					
	4 Std.		12 Std.		24 Std.	
5		-	(6,3) x)	-	(6,7)	±
10	(6,2)	-	(6,9)	+(+)	(7,0)	++
15	(6,5)	-	(7,1)	++(+)	(7,1)	++(+)
20	(7,0)	++	(7,2)	+++	(7,2)	+++

x) In Klammern angegebene Zahlen bezeichnen den pH-Wert der Kontroll-Lösung.

b) Beständigkeit und Ammoniakgehalt der Substrate (Amidlösungen)

Um die Amidlösungen längere Zeit verwenden zu können, müssen sie durch Sterilisation keimfrei gemacht werden. Zu diesem Zweck wurden die Lösungen 30 Minuten bei 100° C in den Dampftopf gebracht. Die Lösungen von Acetamid, Benzamid und Nikotinamid erwiesen sich bis zu 6 Wochen nach erfolgter Sterilisation stets als ammoniakfrei; bei Succinamid begann schon kurze Zeit nach der Erhitzung der Ammoniaknachweis ein fragliches Ergebnis zu zeigen. Ein eindeutig positiver Befund konnte bis zu 3 Monaten nach Sterilisation aber nicht erhoben werden. Die Harnstofflösung war dagegen nach der Sterilisation stark ammoniakhaltig. Es wurde daher untersucht, ob eine kürzere Sterilisationsdauer eine stabile Lösung ergibt.

Tabelle 2: Spontane Harnstoffhydrolyse in Abhängigkeit von der Dauer einer Erhitzung auf 100° C

Dauer der Erhitzung auf 100° C in Minuten	Ergebnis des Ammoniak-Nachweises		
	pH der Kontroll-Lösung	Färbung	Beurteilung
5		gelb	-
10		gelb	-
15	6,2	gelb mit Grünschimmer	-
20	6,5	grün-gelb	-
25	6,7	grün	±
30	6,8	grün-blau	+
45	6,9	hellblau	+(+)
60	7,1	blau	++(+)

Tabelle 2 zeigt, daß nur bei Erhitzung bis zu 10 Minuten Dauer kein freier Ammoniak in der Harnstoff-Lösung vorhanden ist. Aus den Ergebnissen muß geschlossen werden, daß es durch länger als 10 Minuten dauerndes Erhitzen zu einer Hydrolyse des Harnstoffes kommt, die mit NH_3-Abspaltung einhergeht. Zum Nachweis der Urease-Aktivität dürfen daher nur kurz sterilisierte Harnstoff-Lösungen benutzt werden.

c) Einfluß der Bebrütungstemperatur auf den Verlauf der Desamidierung

Tabelle 3 zeigt, daß 4 untersuchte aviäre oder "avium-ähnliche" Stämme übereinstimmend bei 37° C amidaseaktiver waren als bei 29 und 45° C.

Die Bebrütung der Keime muß daher bei vergleichenden Untersuchungen mit der gleichen Temperatur erfolgen und sollte bei 37° C durchgeführt werden.

Tabelle 3: Nikotinamidase-Aktivität (t = 12 Std.) bei verschiedenen Bebrütungstemperaturen

Brutschrank-Temperatur	Stamm S 15	Stamm S 27	Stamm Av 8	Stamm Av Gall W
29° C	+	++	+	+
37° C	+(+)	+++	++	++
45° C	+	++	+	+

d) Einfluß unterschiedlicher Mengenverhältnisse der 3 Reagenzien auf das Ergebnis des NH_3-Nachweises nach RUSSELL

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, daß eine Verdreifachung der einzelnen Reagenzien keine wesentliche Änderung des Ausfalls der Probe verursacht.

Der Ammoniak-Nachweis nach RUSSELL ist daher für umfangreiche und rasch durchzuführende Untersuchungen geeignet.

Tabelle 4: Ammoniak-Nachweis nach RUSSELL mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen der 2 Reagenzien

Menge in ml Mangansulfatlösg. - Hypochloritlösg. - Phenolreagenz	Stamm Av Gall W	Stamm Av 69	Stamm Av 8
0,1 - 0,5 - 1,0	(6,2) -	-	(6,4) -
0,3 - 0,5 - 1,0	-	-	(6,3) -
0,1 - 1,5 - 1,0	(6,2) -	-	(6,3) -
0,1 - 0,5 - 3,0	-	-	(6,3) -
0,1 - 0,2 - 1,0	-	-	-

2. Hauptversuche

a) Untersuchung der acylamidatischen Ausrüstung von aus Schweinelymphknoten gewonnenen Mycobakterien

Prüfung auf Acetamidase, Benzamidase, Urease und Succinamidase:
Die 75 als 1. Gruppe bezeichneten Stämme und die 18 einer Hühnerpassage unterzogenen Kulturen der 2. Gruppe wurden mit den Reaktionszeiten t = 4 Stunden und t = 12 Stunden auf ihr fermentatives Verhalten gegen Acetamid, Benzamid, Harnstoff und Bernsteinsäureamid geprüft.

Tabelle 5: Enzymatische Spaltung von Acetamid. Benzamid, Harnstoff und Succinamid durch 75 aus Schweinen gewonnene Stämme (lfd. Nr. 1 - 75 = 1. Gruppe) und 18 aus Hühner isolierte Stämme (Lfd. Nr. 76 - 93 = 2. Gruppe)

Lfd. Nr.	Acetamid		Benzamid		Harnstoff		Succinamid	
	4 Std.	12 Std.	4 Std.	12 Std.	4 Std.	12 Std.	4 Std.	12 Std.
1	+	+++	-	-	-	+++	-	-
2 - 75	-	-	-	-	-	-	-	-
76 - 93	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 5 zeigt, daß nur der Stamm lfd. Nr. 1 in der Lage war, Acetamid und Harnstoff zu spalten; Benzamid und Succinamid wurden von diesem Stamm nicht angegriffen. Alle übrigen 92 Kulturen verhielten sich gegen die 4 untersuchten Amide neutral.

Prüfung auf Nikotinamidase:
In den Tabellen 6 und 7 ist das nikotinamidatische Verhalten der 75 Stämme aus der 1. Gruppe aufgezeichnet, wobei Tabelle 6 die Ergebnisse der Versuche mit auf Löwenstein-Jensen-Nährböden gewachsenen Kulturen, Tabelle 7 hingegen diejenigen der von Glycerin enthaltenden Petragnani-Nährböden stammenden anzeigt. Jede Angabe steht für mindestens 3 gleichartige Untersuchungen.

Tabelle 6: Nikotinamidase-Aktivität von 75 Stämmen (1. Gruppe) nach Vorzucht auf Löwenstein-Jensen-Nährböden in 2 Altersstufen der Kulturen (rund 1 Monat = 28 - 35 Tage und rund 2 Monate = 58 - 66 Tage)

Zahlen in Klammern: pH-Wert der Kontrollflüssigkeit.
t = Reaktionszeit.

Lfd. Nr.	t = 4 Stunden Kulturalter		t = 12 Stunden Kulturalter		t = 24 Stunden Kulturalter	
	1 Mon.	2 Mon.	1 Mon.	2 Mon.	1 Mon.	2 Mon.
1	-	-	-	-	-	-
2	-	(6,5) -	-	+(+)	++(+)	+++
3	-	(6,6) -	-	++	++(+)	+++
4	(6,4) -	+	+	+(+)	±	+++
5	-	(6,3) -	-	±	±	±
6	-	(6,6) -	++	+(+)	+++	++(+)
7	-	(6,3) -	-	(6,4) -	+	++(+)
8	-	(6,3) -	+	+(+)	+++	++
9	-	±	+	+(+)	+++	+++
10	-	+(+)	-	+(+)	+++	+++
11	-	(6,6) -	±	+(+)	++(+)	+++
12	-	±	-	+	++	+++
13	-	±	-	+(+)	+++	+++
14	-	(6,3) -	-	+	++	+++
15	-	+	-	+(+)	++	+++
16	-	+	-	+(+)	++(+)	+++
17	-	(6,5) -	-	++	+	++
18	-	+	-	++	+++	+++
19	-	-	-	+	-	++(+)
20	-	+	-	++	+++	+++
21	-	-	-	+(+)	±	++(+)
22	-	(6,5) -	-	+(+)	++	+++
23	-	+	-	++	+++	+++

Lfd. Nr.	t = 4 Stunden Kulturalter		t = 12 Stunden Kulturalter		t = 24 Stunden Kulturalter	
	1 Mon.	2. Mon.	1 Mon.	2 Mon.	1 Mon.	2 Mon.
24	-	+	-	+(+)	+++	+++
25	-	+(+)	-	++(+)	+++	+++
26	-	-	-	(6,3) -	-	±
27	±	+	+++	+(+)	+++	+++
28	-	(6.6) -	-	+	+++	+++
29	-	(6,6) -	-	+(+)	+++	+++
30	-	+(+)	-	++	+++	+++
31	-	(6,3) -	-	++	(6,5) -	+++
32	-	+(+)	++	++(+)	+++	+++
33	-	(6,3) -	±	++	+	+++
34	-	+	±	+++	++	+++
35	-	(6.3) -	±	+	++	+++
36	-	++	±	++	++	+++
37	-	-	±	+	+++	++(+)
38	-	+	++	++(+)	+++	+++
39	-	(6,5) -	-	++(+)	+++	+++
40	-	+	+	++(+)	++(+)	+++
41	-	-	+	-	-	-
42	-	+	+	+++	±	+++
43	-	-	-	(6,3) -	±	+
44	-	(6,6) -	±	++(+)	+++	+++
45	-	±	++	++	+++	+++
46	-	(6,2) -	-	++	(6,5) -	+++
47	-	+(+)	-	+++	++(+)	+++
48	-	±	-	++	++	+++
49	-	+(+)	-	+++	+	+++
50	-	±	+	++(+)	+(+)	+++
51	-	(6,6) -	±	+++	+(+)	+++
52	-	-	-	-	-	(6,6) -

Lfd. Nr.	t = 4 Stunden Kulturalter		t = 12 Stunden Kulturalter		t = 24 Stunden Kulturalter	
	1 Mon.	2 Mon.	1 Mon.	2 Mon.	1 Mon.	2 Mon.
53	-	±	+	+++	+	+++
54	-	+(+)	++(+)	++(+)	+++	+++
55	-	(6,4) -	-	++	-	+++
56	-	±	-	++(+)	+++	+++
57	±	(6,2) -	-	++(+)	(6,6) -	+++
58	-	+(+)	++	++(+)	+++	+++
59	-	±	(6,6)-	++(+)	++	+++
60	-	-	(6.6) -	++	++	+++
61	-	(6,3) -	±	±	++(+)	+
62	-	-	+	-	-	-
63	-	(6,4) -	±	++	+	+++
64	(6.6) -	+	++	++(+)	+++	++(+)
65	(6,6) -	±	++	+++	+++	+++
66	-	±	(6,6) -	+++	++	+++
67	-	+(+)	+++	+++	+++	+++
68	-	±	±	++(+)	+++	+++
69	-	±	+	++(+)	++(+)	+++
70	-	(6,6) -	+	+	+++	++
71	-	±	++	+++	+++	+++
72	-	+(+)	±	++	+++	+++
73	-	(6.2) -	+	+	+++	+++
74	-	(6.2) -	++	++	+++	++(+)
75	-	±	++	++	+++	+++

Tabelle 7: Nikotinamidase-Aktivität von 75 Stämmen (1. Gruppe) nach Vorzucht auf Nährböden nach Petragnani (mit Glycerin) in 2 Altersstufen der Kulturen (rund 1 Monat = 28 - 35 Tage und rund 2 Monate = 58 - 66 Tage)

Zahlen in Klammern: pH-Wert der Kontrollflüssigkeit.
t = Reaktionszeit.

Lfd. Nr.	t = 4 Stunden Kulturalter		t = 12 Stunden Kulturalter		t = 24 Stunden Kulturalter	
	1 Mon.	2 Mon.	1 Mon.	2 Mon.	1 Mon.	2 Mon.
1	-	-	-	-	-	-
2	-	(6,6) -	-	+++	+++	+++
3	-	(6,6) -	-	++	+++	+++
4	(6,4) -	(6,6) -	+	+++	++	+++
5	-	-	-	-	-	-
6	-	(6,4) -	+	+++	+++	+++
7	-	(6,4) -	-	++	+	++(+)
8	-	-	-	-	-	-
9	-	±	-	+++	-	+++
10	-	+	(6,6) -	+++	+++	+++
11	-	-	-	+	(6,4) -	++(+)
12	-	-	-	-	-	++
13	-	-	-	±	(6,4) -	++(+)
14	-	-	-	-	-	-
15	-	(6,4) -	-	+++	(6,6) -	+++
16	-	±	-	+++	±	+++
17	-	-	-	±	++(+)	++(+)
18	-	±	-	+++	(6,2) -	+++
19	-	-	-	+	-	++(+)
20	-	-	-	++	-	+++
21	-	-	-	(6,6) -	+	++(+)
22	-	-	-	(6,4) -	(6,6) -	+
23	-	(6,6) -	(6,4) -	+++	+++	+++

Lfd. Nr.	t = 4 Stunden Kulturalter		t = 12 Stunden Kulturalter		t = 24 Stunden Kulturalter	
	1 Mon.	2 Mon.	1 Mon.	2 Mon.	1 Mon.	2 Mon.
24	-	-	+	+(+)	+++	+++
25	-	±	(6,6) -	+++	+++	+++
26	-	-	-	-	-	-
27	(6,6) -	-	++(+)	+(+)	+++	+++
28	-	-	-	+(+)	(6,6) -	++(+)
29	-	(6,3) -	-	±	+++	+++
30	-	-	(6,6) -	+(+)	+(+)	++(+)
31	-	-	-	-	(6,4) -	-
32	-	-	+++	++	+++	+++
33	-	-	++	+	+++	+++
34	-	(6,2) -	(6,4) -	++(+)	-	+++
35	-	(6,3) -	++	++(+)	+++	+++
36	-	(6,4) -	(6,4) -	+++	±	+++
37	-	-	-	-	-	(6,4) -
38	-	(6,2) -	++	++	+++	+++
39	-	-	(6,4) -	(6,5) -	-	++(+)
40	-	-	(6,6) -	+(+)	(6,6) -	+++
41	-	-	-	-	-	-
42	-	(6,3) -	++	+++	++(+)	+++
43	-	-	-	-	(6,3) -	(6,5) -
44	-	-	-	±	-	++(+)
45	-	(6,2) -	+	+++	++(+)	+++
46	-	-	-	(6,4) -	(6,5) -	+
47	-	-	-	++	-	+++
48	-	(6,2) -	++(+)	++(+)	+++	+++
49	-	(6,2) -	(6,3) -	+++	-	+++
50	-	-	+	-	+	+
51	-	(6,3) -	(6,5) -	+++	(6,5) -	+++
52	-	-	-	-	-	(6,3) -
53	-	-	++	++	+	+++

Lfd. Nr.	t = 4 Stunden Kulturalter		t = 12 Stunden Kulturalter		t = 24 Stunden Kulturalter	
	1 Mon.	2 Mon.	1 Mon.	2 Mon.	1 Mon.	2 Mon.
54	-	(6,2) -	++(+)	++(+)	+++	+++
55	-	-	-	(6,3) -	-	+++
56	-	(6,2) -	-	++(+)	-	+++
57	-	-	(6,6) -	(6,6) -	(6,6) -	++(+)
58	-	(6,2) -	+(+)	++	++	+++
59	-	-	(6,6) -	(6,6) -	-	(6,6) -
60	-	-	-	-	-	(6,6) -
61	-	-	-	(6,6) -	+	(6,6) -
62	+	+++	++	+++	+++	+++
63	-	-	(6,3) -	(6,6) -	(6,6) -	+++
64	-	(6,2) -	(6,6) -	++	+++	+++
65	-	(6,2) -	++	++(+)	+++	+++
66	-	-	-	±	++	+++
67	-	±	+(+)	+(+)	+++	+++
68	-	(6,4) -	++	++	+++	+++
69	-	-	-	-	±	±
70	-	-	(6,6) -	±	+++	+++
71	-	(6,6) -	++	++	+++	+++
72	-	(6,3) -	+++	+++	+++	+++
73	-	-	+	+++	+++	+++
74	-	-	+	+	+++	++
75	+	+	+++	+++	+++	+++

Von den 4 Wochen lang auf Löwenstein-Jensen-Medium bebrüteten Stämmen spalteten nach einer Reaktionszeit (t) von 4 Stunden 2 der 75 Stämme Nikotinamid. Nach t = 12 Stunden zeigten insgesamt 37 und nach t = 24 Stunden 65 der 75 untersuchten Stämme Nikotinamidasewirkung.

Von den 8 Wochen lang auf Löwenstein-Jensen-Medium bebrüteten Stämmen spalteten nach t = 4 Stunden 39 Stämme, nach t = 12 Stunden 68 Stämme und nach t = 24 Stunden 71 der 75 Stämme Nikotinamid.

Von den 4 Wochen lang auf Petragnani-Nährböden (mit Glycerin) bebrüteten Stämmen spalteten nach t = 4 Stunden 2 Stämme, nach t = 12 Stunden 24 Stämme und nach t = 24 Stunden 41 Stämme Nikotinamid.

Von den 8 Wochen lang auf Petragnani-Nährböden (mit Glycerin) bebrüteten Stämmen spalteten nach t = 4 Stunden 8 Stämme, nach t = 12 Stunden 52 Stämme und nach t = 24 Stunden 62 der 75 untersuchten Stämme Nikotinamid.
Überhaupt keine Nikotinamidase konnte in den beiden Stämmen Nr. 1 und Nr. 52 gefunden werden.

Vergleicht man die Ergebnisse des Nikotinamidase-Nachweises bei Löwenstein-Jensen- und Petragnani-Kulturen derselben Stämme, so ergeben sich in abgerundeten Prozentzahlen ausgedrückt folgende Verhältnisse:

	t = 4 Std.		t = 12 Std.		t = 24 Std.	
	junge Kulturen	alte Kulturen	junge Kulturen	alte Kulturen	junge Kulturen	alte Kulturen
Reaktionsausfall bei beiden Nährmedien übereinstimmend	92%	16%	45%	17%	40%	61%
Bei Löwenstein-Jensen stärkere Amidspaltung	5%	79%	31%	56%	47%	32%
Bei Petragnani stärkere Amidspaltung	3%	5%	24%	27%	13%	7%

Die Fermenttätigkeit der Löwenstein-Jensen-Kulturen war also in den meisten Fällen wesentlich stärker als die der Petragnani-Kulturen.

Wie außerdem aus vorstehender Aufstellung erkenntlich ist, bestanden aber nicht nur Unterschiede im Reaktionsausfall, die durch Züchtung auf verschiedenen Nährmedien bedingt waren, sondern es bestanden auch Unterschiede in den fermentativen Leistungen jüngerer und älterer Kulturen. So reagierten die auf Löwenstein-Jensen-Nährböden gezüchteten Stämme der beiden Altersgruppen in folgenden Verhältnissen zueinander:

	t = 4 Std.	t = 12 Std.	t = 24 Std.
Reaktionsausfall bei älteren und jüngeren Kulturen übereinstimmend	12%	14%	40%
Fermenttätigkeit bei älteren Kulturen stärker	87%	81%	49%
Fermenttätigkeit bei jüngeren Kulturen stärker	1%	5%	11%

Bei Kulturen von Petragnani-Nährböden ergaben sich folgende Verhältnisse:

	t = 4 Std.	t = 12 Std.	t = 24 Std.
Reaktionsausfall bei älteren und jüngeren Kulturen übereinstimmend	56%	34%	45%
Fermenttätigkeit bei älteren Kulturen stärker	43%	61%	51%
Fermenttätigkeit bei jüngeren Kulturen stärker	1%	5%	4%

Bei beiden Nährmedien zeigten die 2 Monate alten Kulturen eine bedeutend stärkere Enzymtätigkeit als die der 1 Monat alten Kulturen.

b) Vergleich der enzymatischen Ausrüstung von 6 Stämmen vor und nach Hühnerpassage

In den Tabellen 8, 9 und 10 werden die Ergebnisse des Nikotinamidase-Nachweises bei 6 aus Schweinelymphknoten isolierten Stämmen den entsprechenden Resultaten nach einer Hühnerpassage gegenübergestellt, wobei von jedem Stamm 3 aus den Organen Leber, Lunge und Milz isolierte Kulturen berücksichtigt wurden. Aus Tabelle 8 geht hervor, daß 5 der 6 Stämme nach einer Passage über Hühner bei 4stündiger Reaktionszeit eine höhere Nikotinamidase-Aktivität besaßen als vor der Passage. Lediglich der Stamm S 46 bildete davon eine Ausnahme.

Nach 12 Stunden (Tabelle 9) war der Unterschied nur noch bei 2 der 6 Stämme (S 9 und S 45) zu bemerken.
Nach 24 Stunden (Tabelle 10) zeigte nur noch der Stamm S 9 im Ausgangsmaterial eine etwas schwächere Enzymwirkung als in den Hühnerorgan-Stämmen. Aktivitätsunterschiede, die an bestimmte Organe gebunden waren, ließen sich nicht feststellen.

Tabelle 8: Nikotinamidase-Aktivität von 6 Mycobakterien-Stämmen vor und nach einer Hühnerpassage

Reaktionszeit (t) = 4 Stunden

Stamm	vor Hühnerpassage	nach Hühnerpassage isoliert aus		
		Leber	Lunge	Milz
S 3	(6,6) -	+(+)	(6,3) -	±
S 9	(6,3) -	+	+	+
S 45	(6,6) -	+(+)	+(+)	+
S 46	+(+)	+	+	+
S 67	(6,6) -	±	+	+(+)
S 86	(6,2) -	+(+)	+(+)	+(+)

Tabelle 9 Reaktionszeit (t) = 12 Stunden

Stamm	vor Hühnerpassage	nach Hühnerpassage isoliert aus		
		Leber	Lunge	Milz
S 3	++	++	++	++
S 9	(6,4) -	++	++	++
S 45	+(+)	++	++	++
S 46	++	++	++	++
S 67	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)
S 86	++(+)	++(+)	++(+)	++(+)

Tabelle 10 Reaktionszeit (t) = 24 Stunden

S 3	+++	+++	+++	+++
S 9	++(+)	+++	+++	+++
S 45	+++	+++	+++	+++
S 46	+++	+++	+++	+++
S 67	+++	+++	+++	+++
S 86	+++	+++	+++	+++

c) Fermentative Leistungen von 9 "atypischen" Mycobakterien-Stämmen (3. Gruppe)

Von den 9 untersuchten Stämmen zeigte, wie aus der Tabelle 11 zu ersehen ist, nur der 1. (Nr. 94) die Fähigkeit, Acetamid, Benzamid und Bernsteinsäureamid zu spalten. Dieser Stamm bildete auch Urease und Nikotinamidase, die schon nach t = 4 Stunden einen stark positiven NH_3-Nachweis bedingten. Die anderen Stämme spalteten nach t = 4 Stunden keines der Amide. Nach t = 12 Stunden waren mit Ausnahme von Nr. 101 alle Stämme mehr oder weniger deutlich nikotinamidase-positiv. Auch Ureasewirkung war nach dieser Zeit bei allen Stämmen außer Nr. 102 schon nachweisbar. Nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden konnten Nikotinamidase und Urease stets, die anderen Amidasen nicht nachgewiesen werden.

Der Stamm Nr. 94 ist auf Grund seiner Morphologie und in Übereinstimmung mit der enzymatischen Ausrüstung als Mycobacterium smegmatis anzusehen. Die Fähigkeit, Benzamid und Bernsteinsäureamid fermentativ zu spalten, ist nach den Untersuchungen Bönickes spezifisch für Mycobacterium smegmatis. Die anderen Stämme wiesen übereinstimmende enzymatische Fähigkeiten auf und waren auch auf Grund ihres sonstigen Verhaltens in die Gruppe I nach RUNYON als photochromogene Mycobakterien (Mycobact. kansasii) einzureihen.

Tabelle 11: Enzymaktivität von 9 "atypischen" Mycobakterien-Stämmen, gezüchtet auf Löwenstein-Jensen-Nährböden

Lfd. Nr.	Acetamid 12 Std.	Benzamid 12 Std.	Harnstoff 12 Std.	Harnstoff 24 Std.	Nikotinamid 4 Std.	Nikotinamid 12 Std.	Nikotinamid 24 Std.	Succinamid 12 Std.
94	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
95	-	-	++	+++	-	++	++(+)	-
96	-	-	+(+)	+++	-	±	+++	-
97	-	-	++(+)	+++	-	+(+)	+++	-
98	-	-	+	+++	-	±	+++	-
99	-	-	+	+++	-	++(+)	+++	-
100	-	-	+(+)	+++	-	+	+++	-
101	-	-	±	+++	-	-	+++	-
102	-	-	-	++	-	+	+++	-

d) Enzymatische Ausrüstung von 30 Stämmen von Mycobacterium avium (4. Gruppe)

30 aviäre Stämme wurden auf ihr Verhalten gegen Acetamid, Benzamid, Harnstoff, Nikotinamid und Succinamid geprüft. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 12. Keiner dieser Stämme spaltete Acetamid, Benzamid oder Bernsteinsäureamid. Urease war in dem Stamm Nr. 121 nach 24 Stunden und im Stamm Nr. 128 schon nach 12 Stunden nachweisbar. Alle übrigen Stämme desamidierten Harnstoff nicht. Die Fähigkeit zum fermentativen Abbau von Nikotinamid war dagegen allen Stämmen mit Ausnahme von Nr. 128 eigen. Knapp die Hälfte der Stämme zeigte diese Wirkung erst nach 24 Stunden. Da für diese Untersuchungen Kulturen im Alter von

3 - 4 Wochen verwendet wurden, stimmt die enzymatische Ausrüstung von 29 Stämmen der 4. Gruppe (Mycobacterium avium) mit derjenigen der 1. und 2. Gruppe überein, bei denen es sich somit ebenfalls um Angehörige der Species Mycobacterium avium handeln dürfte.

Tabelle 12: Enzymaktivität von 30 aviären Mycobakterien-Stämmen (4. Gruppe), gezüchtet auf Löwenstein-Jensen-Nährböden

Lfd. Nr.	Acet-amid	Benz-amid	Harnstoff		Nikotinamid			Succin-amid
	12 Std.	12 Std.	12 Std.	24 Std.	4 Std.	12 Std.	24 Std.	12 Std.
103	-	-	-	-	(6,2) -	+(+)	++(+)	-
104	-	-	-	-	-	(6,6) -	++(+)	-
105	-	-	-	-	(6.3) -	+	++(+)	-
106	-	-	-	-	(6,1) -	(6,3) -	+	-
107	-	-	-	-	-	(6,3) -	++	-
108	-	-	-	-	-	(6,2) -	±	-
109	-	-	-	-	-	+	+++	-
110	-	-	-	-	-	(6,6) -	++(+)	-
111	-	-	-	-	-	±	++	-
112	-	-	-	-	-	+	+(+)	-
113	-	-	-	-	(6,6) -	+	+++	-
114	-	-	-	-	-	+	+++	-
115	-	-	-	-	-	(6,6) -	+++	-
116	-	-	-	-	(6,2) -	++	+++	-
117	-	-	-	-	-	(6,4) -	+++	-
118	-	-	-	-	-	(6,2) -	++(+)	-
119	-	-	-	-	+(+)	+(+)	+++	-
120	-	-	-	-	-	±	+++	-
121	-	-	-	++	+	+	+++	-
122	-	-	-	-	(6,2) -	+	++	-
123	-	-	-	-	-	+	++	-
124	-	-	-	-	-	(6,3) -	++	-
125	-	-	-	-	-	(6,3) -	+(+)	-
126	-	-	-	-	±	+	++	-
127	-	-	-	-	-	+	+++	-
128	-	-	+	+++	-	-	-	-

Lfd. Nr.	Acet-amid	Benz-amid	Harnstoff		Nikotinamid			Succin-amid
	12 Std.	12 Std.	12 Std.	24 Std.	4 Std.	12 Std.	24 Std.	12 Std.
129	-	-	-	-	-	(6, 6) -	+++	-
130	-	-	-	-	(6, 2) -	+(+)	+++	-
131	-	-	-	-	(6, 3) -	++	+++	-
132	-	-	-	-	-	(6, 3) -	+	-

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die von Bönicke und seinen Mitarbeitern (3 - 9) erforschte Enzymaktivität der Mycobakterien ist zur Grundlage mehrerer Differenzierungsverfahren gemacht worden. Für einzelne Mycobakterien-Arten, besonders für die saprophytären, ist durch die unterschiedliche fermentative Spaltung von Carbonsäureamiden ein charakteristisches "Spektrum" in Bönickes "Amid-Reihe" gefunden worden. Solche enzymatischen Untersuchungen sind nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, sondern sie sind allgemein für die Klassifizierung und Differenzierung der Mycobakterien von großer Bedeutung. Voraussetzung für eine allgemeine Einführung dieser Differenzierungsmethode in die normale Laborpraxis ist allerdings, daß dem keine technischen Schwierigkeiten entgegenstehen.

Im ersten Teil der hier mitgeteilten Untersuchungen wurde geprüft, inwieweit der Nachweis von acylamidatischen Leistungen der Bakterien durch unkontrollierbare oder schwer zu vermeidende Faktoren beeinflußt werden kann.

Die erste Frage galt der Menge der Bakterien, die für den Versuch benötigt wird. Da im allgemeinen die zur Verfügung stehende Bakterienmenge, besonders bei dem Ansetzen einer langen "Amid-Reihe", nicht allzu groß sein dürfte, mußte das kleinstmögliche Quantum gesucht werden, das den Ablauf der Reaktion noch garantiert. Bönicke verwendete Konzentrationen von 5, 10 oder 20 mg Feuchtgewicht Bakterien pro 1 ml Suspensionsmittel. Die erste hier beschriebene Untersuchung zeigt nun, daß das Ergebnis des Nikotinamidase-Nachweises schon von diesen Schwankungen der Bakteriendichte erheblich beeinflußt wird. Je kürzer die Reaktionszeit (t), desto größer ist die Differenz. Bei t = 4 Stunden bewirken 0,5 ml einer Bakteriensuspension der Konzentration 5 mg/ml keinerlei meßbare Amidspaltung, während die gleiche Menge einer Suspension mit 20 mg/ml einen hohen positiven Ausfall ergibt. Dieser Fehler wird sich bei Durchführung der Probe sicher oft bemerkbar machen, da das Wiegen des Bakteriensedimentes nach dem unbedingt nötigen Waschen und Zentrifugieren durch das unterschiedliche Wasserbindungsvermögen der Bakterienstämme erschwert wird. Um diesen Fehler so klein wie möglich zu halten, habe ich vor dem Wiegen der Bakterien die Röhrchen umgekehrt 10 Minuten lang abtropfen lassen und sie anschließend noch 1 Stunde in den Brutschrank (37° C) gestellt. Das Bak-

teriensediment selbst wird durch diesen Prozeß nicht ausgetrocknet; es werden aber die am Glas haftenden Wassertropfen beseitigt, von denen einer meist mehr wiegt als die Bakterien selbst. Die Einstellung der Dichte nach optischen Gesichtspunkten unter Zuhilfenahme von geeichten Vergleichsröhrchen hat den Nachteil, daß es Stämme mit unterschiedlicher Homogenisierbarkeit gibt und somit ebenfalls erhebliche Dichtunterschiede zustande kommen können.

Die Sterilisation der Amid-Lösungen führte Bönicke (9) mit 20 - 30 Minuten langem Erhitzen auf 100° C durch. Nach den vorliegenden Untersuchungen führt dieses Verfahren zum Entstehen von freiem Ammoniak in Harnstoff- und Bernsteinsäureamid-Lösungen. Da durch ein sehr kurzes Erhitzen das Ziel der Keimfreimachung nicht erreicht wird, sollte vor allem das Lösungsmittel (Aqua dest.) vor Einbringen des Substrates sterilisiert werden. Die Gefahr einer Keimverunreinigung durch die winzige Menge des Amides (meist nur einige Milligramm) ist gering, muß aber durch Aufbewahrung der Lösung im Kühlschrank noch eingeengt werden. Durch den späteren Aufenthalt im Brutschrank bei 37° C für längere Zeit könnten sich sonst unter Umständen vorhandene Keime so stark vermehren, daß der Ablauf der Fermentreaktion beeinflußt würde.

Die allgemein übliche Bebrütungstemperatur während der Reaktionszeit beträgt 37° C und hat sich auch nach den hier beschriebenen Versuchen als die der Fermenttätigkeit förderlichste erwiesen.

Zum Nachweis von Ammoniak wurde von Bönicke (9) und von Schliesser (26) die Phenol-Hypochlorit-Methode nach RUSSELL benützt und empfohlen. Der Arbeitsaufwand ist gering, das Ergebnis deutlich ablesbar und kaum beeinflußt durch eventuell vorkommende Fehlmengen der Reagenzien, deren Verdreifachung noch keine wesentlichen Änderungen des Ergebnisses zur Folge hatte. Selbstverständliche Voraussetzungen für die Zuverlässigkeit des Ammoniak-Nachweises ist aber, daß alle verwendeten Reagenzien, Geräte, Gläser etc. während aller Stadien des Versuches absolut frei von Ammoniak sind und daß deshalb stets entsprechende Kontrollen mitlaufen müssen.

Von großem Einfluß auf den Ausfall der Enzymreaktion ist das Alter der Kultur, d. h. die Dauer der erfolgten Bebrütung. Bei den unter-

suchten Mycobakterien lag der Höhepunkt der Enzymtätigkeit bei zirka 60 - 70 Tagen Bebrütungsdauer. Besonders bei kurzen Reaktionszeiten war die Enzymaktivität der rund 2 Monate lang bebrüteten Kulturen viel stärker als die der rund 1 Monat lang bebrüteten: bei t = 4 Stunden reagierten in 87%, bei t = 12 Stunden in rund 50% der Fälle die älteren Kulturen stärker als die jüngeren, wobei die Ergebnisse bei Kulturen der beiden verwendeten Nährmedien nach Löwenstein-Jensen und Petragnani fast das gleiche Prozentualverhältnis zeigten. Bei vergleichenden Untersuchungen von mehreren Stämmen müssen daher unbedingt gleichaltrige Kulturen verwendet werden.

Ein Einfluß verschiedener Nährmedien zeigte sich in den vergleichenden Untersuchungen zwischen Löwenstein-Jensen- und glycerinhaltigen Petragnani-Kulturen. Bei kurzer Reaktionszeit (t = 4 Stunden) reagierten fast 80% der auf Löwenstein-Jensen-Nährböden bebrüteten Bakterien deutlich stärker als die gleichaltrigen Petragnani-Stämme. Nach t = 12 Stunden lag das Verhältnis immer noch bei 56%. 6 Stämme, die auf Löwenstein-Jensen-Nährböden nikotinamidase-positiv waren, spalteten nach Züchtung auf Petragnani-Nährböden Nikotinamid nicht. Für die Durchführung des Nikotinamidase-Nachweises ist daher das Löwenstein-Jensen-Medium vorzuziehen. Werden in derselben Versuchsreihe Kulturen beider Medien verwendet, muß für die Petragnani-Kulturen eine längere Reaktionszeit gewählt werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Im Hinblick auf die Klassifizierung der aus Schweinelymphknoten isolierten Mycobakterien-Stämme lieferten die Amidase-Nachweise ein klares Ergebnis. Ein Stamm spaltete nur Acetamid und Harnstoff, was ihn nach dem Differenzierungsschema von Bönicke als Mycobacterium fortuitum ausweist. Dieser Stamm (lfd. Nr. 1) unterschied sich auch in morphologischen Eigenschaften deutlich von den restlichen 74 Stämmen, von denen i. d. R. nur Nikotinamid gespalten wurde. Ein Stamm befand sich allerdings darunter, dessen Nikotinamidase-Aktivität äußerst gering und deutlich verzögert war. In diesem Fall zeigte sich erst nach einer Reaktionszeit von 24 Stunden eine leichte Grünfärbung der sonst gelben Kontrollflüssigkeit, was darauf hinwies, daß die Fähigkeit zur Spaltung von Nikotinamid zwar vorhanden war, aber ungewöhnlich lange Zeit in Anspruch nahm.

Die Überimpfung der aus Schweinen gewonnenen Mycobakterien an Hühner und ihre Wiedergewinnung aus den Organen der Tiere hatte keine grund-

sätzliche Änderung ihrer enzymatischen Ausrüstung zur Folge. Es fiel allerdings auf, daß nach der Hühnerpassage die Fermenttätigkeit meist schon nach kürzerer Reaktionszeit einsetzte.

Die Ausrüstung mit Nikotinamidase und die Unfähigkeit, die anderen beschriebenen Amide zu spalten, sieht Bönicke als Charakteristikum der Gattung Mycobacterium avium an. Dasselbe enzymatische Verhalten bei 74 von 75 aus Schweinelymphknoten isolierten Mycobakterien-Stämmen und das auch kulturmorphologisch einheitliche und typische Verhalten erlauben deshalb den Schluß, daß es sich bei diesen Stämmen ebenfalls um Geflügeltuberkelbakterien gehandelt hat. Dieser Befund wird durch die Tatsache bestätigt, daß sich bisher 28 geprüfte Stämme auch als hühnervirulent erwiesen haben (mündliche Mitteilung Dr. Schliesser), und andererseits die hühnervirulenten aviären Stämme der Stammsammlung des Tierhygiene-Institutes (4. Gruppe) das gleiche enzymatische Verhalten zeigten.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Amidase-Aktivität von 75 Mycobakterien-Stämmen, die aus veränderten Darmlymphknoten von Schlachtschweinen stammten, von 9 sogenannten "atypischen" Mycobakterien-Stämmen und von 30 Geflügeltuberkelbakterien-Stämmen aus einer Stammsammlung nach der Methode von Bönicke untersucht. Es ergab sich:

1.) Von den aus Schweinen isolierten Stämmen spalteten 74 nur Nikotinamid. Sie verhielten sich somit genau so wie Stämme der Species Mycobacterium avium.
Ein Stamm spaltete nur Acetamid und Harnstoff und verhielt sich somit wie Keime der Species M. fortuitum.

2.) Bei 5 von 6 Stämmen konnte durch eine Hühnerpassage, die zum Tod der Tiere geführt hatte, die Nikotinamidase-Aktivität in geringem Maße gesteigert werden.

3.) Um vergleichbare, sichere und taxonomisch verwertbare Ergebnisse zu erhalten, ist es unbedingt nötig, mit streng standardisierter Untersuchungstechnik und unter Heranziehung ausgiebiger Kontrollen zu arbeiten.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Andrade, L. de und J. Ferreira: Urease-Aktivität beim Genus Mycobacterium. Anais de Microbiol. 4, 105 (1956) Ref. Zbl. Bakter. 169, 251 (1958)

2. Bojalil, L. F. and J. Cerbon: A comparative study of nonphotochromogenic mycobacteria and M. avium. Amer. Rev. Resp. Dis. 81, 382 (1960)

3. Bönicke, R.: Vergleichende Untersuchungen über die enzymatische Desamidierung aromatischer Amide durch isoniacidsensible und -resistente Tuberkelbakterienstämme vom Typus humanus. Naturwiss. 44, 619 (1957)

4. Bönicke, R.: Die Identifizierung von Mycobacterium smegmatis mit Hilfe des Bernsteinsäureamidase-Nachweises. Naturwiss. 46, 516 (1959)

5. Bönicke, R.: Eine weitere Methode zur schnellen Identifizierung von Bakterienstämmen der Species Mycobacterium smegmatis (Trevisan Lehmann und Neumann). Naturwiss. 46, 562 (1959)

6. Bönicke, R.: Die Klassifizierung "atypischer" Mycobakterien durch Bestimmung ihrer unterschiedlichen acylamidatischen Stoffwechselleistungen. Tuberkulosearzt 14, 209 (1960)

7. Bönicke, R. und W. Dittmar: Über das Vorkommen von Cycloamidasen in Mycobakterien. Zbl. Bakter. I. Orig. 170, 366 (1957)

8. Bönicke, R. und B. P. Lisboa: Typendifferenzierung der Tuberkulosebakterien mit Hilfe des Nikotinamidase-Tests. Tuberkulosearzt 13, 377 (1959)

9. Bönicke, R., W. Dittmar und B. P. Lisboa: Über das Vorkommen von Acylamidasen in Mycobakterien.

a) Bönicke, R. und B. P. Lisboa: I. Mitteilung: Die enzymatische Desamidierung aromatischer und aliphatischer Carbonsäureamide. Zbl. Bakter. I. Orig. 175, 403 (1959)

b) Bönicke, R., W. Wittmar und B. P. Lisboa: II. Mitteilung: Der enzymatische Abbau von Harnstoff (Urease). Zbl. Bakter. I. Orig. 177, 380 (1960)

c) Bönicke, R.: III. Mitteilung: Der enzymatische Abbau von Allantoin. Zbl. Bakter. I. Orig. 178, 186 (1960)

d) Bönicke, R.: IV. Mitteilung: Die Differenzierung schnell wachsender Mycobakterien der Species M. smegmatis, M. phlei, M. fortuitum und M. thamnopheos durch Nachweis ihrer unterschiedlichen acylamidatischen Stoffwechselleistungen. Zbl. Bakter. I. Orig. 178, 209 (1960)

e) Bönicke, R.: V. Mitteilung: Die Identifizierung von "atypischen" Mycobakterien der photochromogenen Gruppe mit Hilfe der "Amid-Reihe". Zbl. Bakter. I. Orig. 178, 223 (1960)

10. Braun, A.: Zur Praxis der Typenbestimmung von Mycobacterium tuberculosis. Zschr. f. Hyg. 147, 79 (1960)

11. Corper, H. J. and H. C. Sweany: J. Bact. 3, 128 (1917)

12. Engbaek, H. C. and Magnusson, M.: A bacteriological study of the apathogenic significance of atypical mycobacteria isolated from eleven patients.
Acta tbc. scand 40, 1 (1961)
Ref. Zbl. Tbkforschg. 89, 144 (1961)

13. Freerksen, E.: Die sogenannten atypischen Mycobakterien.
Klin. Wschr. 38, 297 (1960)

14. Halpern, Y. S. and N. Grossowicz: Hydrolysis of amides by extracts from mycobacteria.
Biochem. J. 65, 716 (1957)

15. Hughes, D. E. and D. H. Williamson: The deamidation of nicotinamide by bacteria.
Biochem. J. 55, 851 (1953)

16. Kagramanov, A. I.: La fréquence et l'importance épidémiologique des mycobactéries tuberculeuses atypiques en URSS.
Bull. Intern. Un. Tbc. 29, 354 (1959)

17. Kimura, T.: Studien über den Amidstoffwechsel von Mycobakterien. 4 Mitteilungen.
J. Biochemistry (Tokyo) 46, 973, 1133, 1271, 1399 (1959)
Ref. a. Lz. IV Vet. med. 5, 1214, 1215, 1284 (1960)

18. Kleinsorgen, W. und F. Commichau: Diphtherie-Pseudodiphtherie-Differentialdiagnose durch Nachweis der Ureasereaktion auf einer Harnstoff-Indikator-Platte.
Zbl. Bakter. I. Orig. 139, 57 (1937)

19. Konno, K., Kurzmann, R. and K. Bird: The metabolism of nicotinic acid in mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis. 75, 529 (1957)

20. Kubica, G. P. und A. L. Vestal: The arylsulfatase activity of acid-fast bacilli. Amer. Rev. Dis. 83, 728 (1961)

21. Lebek, G.: Der Kohlenstoff- und Stickstoff-Verwendungsstoffwechsel von ammoniakassimilierenden Stämmen der beiden Säugetiertypen des M. tuberculosis. Zbl. Bakter. I. Orig. 169, 85 (1957)

22. Meissner, Gertrud: Atypische Mycobakterien. III. Mitteilung: Aviäre und avium-ähnliche Stämme. Zbl. Bakter. I. Orig. 180, 510 (1960)

23. Nassal, J.: Ergebnisse und Probleme der aviären Tuberkulose des Rindes. Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. 74, 210 (1961)

24. Püschel, Johanna: Klin. Wschr. 11, 375 (1936); zit. nach Wohlfeil-Weiland und Kleinsorgen-Commichau.

25. Runyon, E. H.: The recognition and characterization of pulmonary mycobacterial pathogens other than tubercle bacilli: a review. Bull. Intern. Un. Tbc. 29, 396 (1959)

26. Schliesser, Th.: Zur Systematik der saprophytären Mycobakterien. Habilitationsschrift, Med. vet. Fak. München 1960.

27. Singer, J. and E. Cysner: Urease activity in mycobacteriaceae. Amer. Rev. Resp. Dis. 65, 779 (1952)

28. Smith, H. W.: The isolation of mycobacteria from the mesenteric lymph-nodes of domestic animals. J. Path. Bact. 68, 367 (1954)

29. Soehngen: Zit. nach Singer-Cysner. Zbl. Bakt. 39, 8 (1913)

30. Stöckl, W. und Mathois, H.: Charakterisierung der aus Schweinelymphknoten isolierten säurefesten Keime als atypische chromogene Mycobakterien. Mhft. f. Tierhk. 11, 73 (1959)

31. Tacquet, A., Ch. Gernez-Rieux et B. Gaudier: L'hydrolyse de l'uree par les mycobacteries, applicationàl'étude des bacilles tuberculeux humains resistants a l'isoniazide. A. Inst. Pasteur, Lille 6, 80 (1955) Ref. Zbl. Tbkforschg. 72, 37 (1956)

32. Toda, T., Y. Hagihara and K. Takeya: A simple urease test for the classification of mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis. 83, 757 (1961)

33. Wayne, Juarez and Nichols: Aryl sulfatase activity of aerobic actinomycetales. J. Bact. 75, 367 (1958)

34. Whitehead, J. E. M., A. R. Morrison and L. Young: Bacterial arylsulfatase. Biochem. J. 51, 585 (1952)

35. Whitehead, J. E. M., P. Wildy and Engbaek, H. C.: Arylsulphatase activity of Mycobacteria. J. Path. Bact. 65, 451 (1953)

36. Wohlfeil, T. und P. Weiland: Untersuchungen über die praktische Bedeutung und Wirkungsgröße der Bakterienurease. Zbl. Bakt. I. Orig. 138, 388 (1937)

37. Wohlfeil, T. und H. Wollenberg: Die Bedeutung der Bakterienurease für die Differentialdiagnose und Typenbestimmung pathogener Bakterien. Zbl. Bakter. I. Orig. 140, 281 (1937)

Herrn Professor Dr. Adolf Meyn danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Herr Privat-Dozent Dr. Th. Schliesser hat meine Arbeit stets verständnisvoll angeleitet. Ich danke ihm für seine Mühe.

LEBENSLAUF

Als Sohn des Kaufmanns Kurt Sachs wurde ich, Gerhard Hans Sachs, am 16. 5. 1928 in Leobschütz geboren. Ich besuchte von 1934 bis 1938 die Kath. Volksschule meiner Geburtsstadt, ab 1938 die dortige Oberschule und Schulen in Ratibor, Breslau und Berlin, bis 1943 eine kriegsbedingte Unterbrechung der Schulausbildung erfolgte. Nach Kriegsende trat ich in die Sonderkurse des Charlottenburger Gymnasiums in Berlin ein und legte im Sommer 1946 die Reifeprüfung ab. Anschließend studierte ich Musik in Berlin und von 1949 an in München, wo ich im Herbst 1952 an der Staatlichen Hochschule für Musik die praktischen und pädagogischen Reifeprüfungen bestand.

Das Studium der Tierheilkunde begann ich 1953 an der Universität München, wo ich auch das Physikum (1955) und 1958 die Tierärztliche Prüfung ablegte. Das 6. Semester hatte ich an der Tierärztlichen Hochschule in Wien und ein folgendes Zwischensemester an der Ecole Nationale Vêtérinaire d'Alfort (Seine) verbracht. Nach der Praktikantenzeit bei Herrn Dr. Hugo Weymar in Altdorf erhielt ich am 15. 4. 1959 die Bestallung als Tierarzt durch das Bayerische Staatsministerium des Innern. Ich war anschließend in der tierärztlichen Praxis und am Schlachthof in Nürnberg tätig, bis ich im Frühjahr 1961 am Tierhygiene-Institut der Universität München mit der Anfertigung vorliegender Arbeit begann.